

CONTROLE DE QUALIDADE DOS VENENOS ANIMAIS E DOS CORRESPONDENTES ANTIVENENOS.

I. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus* usando amostras secas a temperatura ambiente ou liofilizadas.

Maria de Fátima D. FURTADO¹
G.M.D.D., COLLETO^{3*}
Wilmar DIAS DA SILVA²

RESUMO: Para a avaliação das atividades promotoras da coagulação do fibrinogênio e do plasma e indutoras de edema, hemorragia, necrose e mortalidade presentes no veneno de algumas serpentes brasileiras (*B. alternatus*, *B. atrox*, *B. cotiara*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi* e *Crotalus durissus terrificus*) foram padronizados métodos de ensaio. De cada espécie de serpente foram preparadas misturas homogêneas de venenos, o teor protéico determinado pelo método de Lowry et al. (6) e cada mistura dividida igualmente em duas amostras, uma sendo seca sob vácuo à temperatura ambiente (VS) e a outra liofilizada (VL), e ambas armazenadas a 20°C. O teor protéico foi da ordem de 1.0-1.5 mg/mg de veneno seco na maioria das espécies e da ordem de 0.8-0.85 mg/mg no veneno de *B. cotiara*. A atividade enzimática, medida pela proteólise da caseína, foi muito pronunciada nos venenos de *B. atrox* e *B. moojeni*, baixa no veneno de *B. cotiara*, intermediária no veneno das demais espécies do gênero *Bothrops* e praticamente in-

¹ Seção de Venenos e

² Laboratório Especial de Imunoquímica, Instituto Butantan,

³ Serviço de Informática e Análise de Dados do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Correspondência: Dra. Maria de Fátima D. Furtado

Seção de Venenos — Instituto Butantan

Caixa Postal 65 — São Paulo — Brasil

*"A Comissão de Coordenação e Produção de Soros Hiperimunes do Instituto Butantan" recomendou a titulação dos anticorpos específicos para cada uma das principais atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos dos animais peçonhentos da fauna brasileira presentes nos correspondentes soros hiperimunes produzidos pela "Seção de Concentração e Fracionamento de Soros". Esta comunicação relata os resultados referentes à padronização de métodos *in vitro* e *in vivo* que permitem uma avaliação semiquantitativa das principais atividades dos venenos das serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*.

Recebido para publicação em 26.7.1990 e aceito em 18.6.1991

FURTADO, M.F.D., COLLETO, G.M.D.D., DIAS DA SILVA, W. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. I. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus* usando amostras secas à temperatura ambiente ou liofilizadas. *Mem. Inst. Butantan*, v. 53, n. 2, p. 149-159, 1991.

detectável no veneno de *C. d. terrificus*. As atividades hemorrágica e necrotizante, conquanto presentes no veneno de todas as espécies bothrópicas, foram bastante elevadas no veneno de *B. neuwiedi* e ausentes no veneno de *C. d. terrificus*. Todos os venenos testados exibiram atividade edematogênica. A atividade promotora de coagulação, embora presente em todos os venenos, foi mais alta nos venenos de *B. atrox*, *B. cotiara* e *B. neuwiedi*. A atividade letal, medida em termos de DL_{50} , foi marcadamente elevada no veneno de *C. d. terrificus* e alta nos venenos de *B. jararaca* e *B. neuwiedi* em comparação com os venenos das demais serpentes do gênero *Bothrops*. Em todos os ensaios as amostras de veneno VS e VL foram sempre testadas em paralelo. Conquanto as atividades enzimáticas e biológicas dos venenos não se diferissem em ambas as amostras, o processo de liofilização deveria ser o método de escolha pelo fato de associar, durante o processo de secagem, congelação e vácuo, condições que presumivelmente preservariam melhor a configuração molecular natural da maioria das proteínas.

UNITERMOS: *Peçonhas animais, processos de secagem e atividades biológicas dos venenos ofídicos.*

INTRODUÇÃO

As peçonhas de origem animal são misturas complexas ricas em toxinas, enzimas e peptídeos biologicamente ativos. A natureza e as propriedades biológicas desses componentes são típicos da espécie animal de onde provieram enquanto a concentração de cada um deles, dentro da mesma espécie, pode variar com a região geográfica em que o animal se desenvolveu, com os hábitos, com as mudanças das estações, com a idade e o sexo e com o tempo decorrido entre uma extração de veneno e a imediatamente anterior. Além disso, a reunião de enzimas, substratos eventuais e inibidores em proporções variáveis segundo as condições das coletas antecipa proteólises e inibições de enzimas numa série caótica e imprevisível de eventos. Assim, não se pode esperar que as misturas de veneno obtidas pela reunião das amostras de várias coletas sejam homogêneas.

As misturas de veneno antes de ser utilizados quer como material de pesquisa pura quer como antígeno para a produção de soros antivenenos precisam passar pelo crivo de um controle de qualidade no qual sejam incluídos métodos que avaliem tanto as principais características físico-químicas dos venenos como suas atividades bioquímicas e biológicas.

Em 1955 o comitê de especialistas em "Padrões Biológicos da Organização Mundial de Saúde" reuniu-se em Genebra e discutiu o problema da heterogeneidade das misturas de veneno produzidas pelas diferentes instituições públicas e privadas espalhadas pelo mundo e a necessidade da padronização de métodos para a obtenção de padrões internacionais de referência tanto dos venenos de origem animal como dos correspondentes soros antivenenos. Os resultados dessa reunião foram publicados no "19º Informe-OMS" (18). Entre as principais decisões há a sugestão de uma análise do veneno de *Bothrops jararaca* e a possível utilização desse veneno como "veneno-referência" para os venenos do gênero *Bothrops*. Logo depois dessa reunião vários trabalhos foram publicados visando padronizar métodos para a produção de venenos-referência (Schottler, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14). Entretanto, os resultados obtidos não foram satisfatórios.

FURTADO, M.F.D., COLLETO, G.M.D.D., DIAS DA SILVA, W. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. I. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus* usando amostras secas à temperatura ambiente ou liofilizadas. *Mem. Inst. Butantan*, v. 53, n. 2, p. 149-159, 1991.

A Organização Mundial de Saúde retomou esse problema em 1979 quando organizou, em Zurique, um novo encontro dos especialistas para analisar os progressos observados na identificação das atividades biológicas dos venenos animais e nos respectivos antivenenos. Os participantes do encontro recomendaram o estabelecimento de veneno-referência para 8 espécies de serpentes e que esses padrões fossem obtidos por meio de métodos simples que pudessem ser conduzidos mesmo em laboratórios mais modestos (19). Como não havia representantes brasileiros naquela reunião, as serpentes brasileiras não foram incluídas entre as eleitas pelos especialistas que participaram daquele encontro (16, 17, 19) (Tabela 1).

Em 1985 o Ministério da Saúde estimulou o aumento da produção de soros antivenenos no mercado nacional criando o "Grupo de Trabalho sobre Padronização do Soro Antiofídico do Ministério da Saúde" junto ao "Programa de Auto-suficiência em Imunobiológicos" e convocou para um esforço conjunto de produção desses soros o Instituto Butantan, o Instituto Vital Brazil e a Fundação Ezequiel Dias (1). Ficou evidente, desde logo, a necessidade do uso de "Venenos-Referência Nacionais" e a padronização dos métodos de ensaio das atividades biológicas dos venenos para garantir uniformidade aos soros antivenenos e uso no território nacional. Coube ao Instituto Butantan o encargo de preparar e fornecer os venenos às demais instituições. A "Seção de Venenos" do Instituto Butantan, seguindo as normas estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde (19), prepara venenos-referência para os venenos crotálico e botrópico. Durante o preparo desses padrões defrontou-se com a falta de métodos reprodutíveis e de fácil execução para titular as principais atividades biológicas dos venenos e determinar a capacidade neutralizante dos correspondentes soros antivenenos.

A Seção de Venenos, a Seção de Concentração e Fracionamento de Soros e o Laboratório Especial de Imunoquímica estabeleceram um programa colaborativo para desenvolver aqueles métodos.

Neste trabalho são relatados os resultados obtidos com a padronização dos métodos para a determinação da $DL_{50\%}$ em camundongos e das atividades hemorrágica, necrosante, edematogênica, coagulante sobre fibrinogênio, coagulante sobre plasma e caseinolítica usando o veneno das espécies mais comuns do gênero *Bothrops* (*B. alternatus*, *B. atrox*, *B. cotiara*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*) e o veneno do *Crotalus durissus terrificus*. Estes estudos foram feitos analisando-se em paralelo amostras de veneno seco a vácuo como tradicionalmente preparado no Instituto Butantan e amostras de veneno liofilizado.

MATERIAL E MÉTODOS

SERPENTES: Foram utilizadas serpentes pertencentes a 7 espécies do gênero *Bothrops* (*B. alternatus*, *B. atrox*, *B. cotiara*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*) e uma espécie do gênero *Crotalus* (*C. durissus terrificus*). O veneno dessas serpentes, com exceção do veneno da *B. atrox* que foi incluído em substituição ao da *B. pradoi*, são utilizados para o preparo dos soros antivenenos botrópico e crotálico.

Os venenos foram extraídos pelo método tradicionalmente usado no Instituto Butantan. Os frascos contendo as amostras de veneno recém-colhidas foram colocados em banho de água-gelo, agitados para que o resfriamento se processasse rapidamente e, a seguir, divididos em duas alíquotas: uma das alíquotas foi

FURTADO, M.F.D., COLLETO, G.M.D.D., DIAS DA SILVA, W. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. I. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus* usando amostras secas à temperatura ambiente ou liofilizadas. *Mem. Inst. Butantan*, v. 53, n. 2, p. 149-159, 1991.

colocada em placas de Petri que foram transferidas para dessecadores contendo cloreto de cálcio, e deixados à temperatura ambiente, sob vácuo, por 24h, tempo suficiente para a secagem do veneno. A outra alíquota foi centrifugada a 3.000 rpm/15 min a 4°C para remover os resíduos sólidos e liofilizada. A primeira alíquota foi rotulada "veneno seco" e a segunda "veneno liofilizado". Cada amostra continha veneno obtido de vários animais da mesma espécie com idade, sexo e procedência variáveis.

DOSAGEM DE PROTEÍNAS. O teor de proteínas totais de cada amostra de veneno foi determinado pelo método colorimétrico de Lowry et al. (6).

DOSE MÍNIMA COAGULANTE (DMC). A DMC é definida como a menor quantidade de veneno (em mg de veneno seco por litro de solução teste) que coagula ou uma solução de fibrinogênio bovino a 2g/litro (DMC-F) ou uma solução padronizada de plasma eqüino contendo 2,8g de fibrinogênio/litro (DMC-P) em 60 segundos a 37°C. Os valores para DMC-F ou DMC-P foram obtidos através de análise de regressão linear do "tempo de coagulação" sobre a "quantidade de veneno", sendo a última transformada em logaritmo neperiano (ln). É considerada dose mínima a quantidade de veneno que coagula ou o fibrinogênio ou o plasma em 60 segundos.

ATIVIDADE PROTEOLÍTICA SOBRE CASEÍNA. Para a determinação da atividade proteolítica empregou-se o método de Kunitz (4), modificado por Lomonte & Gutierrez (5), que utiliza caseína como substrato. Um mililitro da solução de caseína a 1% foi adicionado a 1 ml da solução de veneno em 0.15 M NaCl e a mistura incubada durante 30 min a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 3,0 ml de ácido tricloroacético a 5% e os tubos deixados em repouso à temperatura ambiente por 30 min. A seguir, os tubos foram centrifugados durante 10 min a 3.000 rpm e as absorvências dos sobrenadantes em densidade óptica foram lidas a 280nm, usando-se, como "branco", a amostra em que a solução de veneno havia sido substituída por salina. Cada amostra de veneno foi ensaiada em quadruplicatas. A atividade proteolítica, tipo caseinolítica, foi expressa em unidades/mg veneno obtida pela fórmula:

$$U/mg = O.D. 280 \text{ nm} \times 100/mg \text{ veneno}$$

DOSE LETAL 50% (DL₅₀). Grupos de 8 camundongos albinos, não-isogênicos, pesando 18 a 22 gramas, foram injetados, i.p., com 0.5 ml de cada solução de veneno diluído em 0.15 M NaCl. O número de animais mortos para cada dose de veneno foi anotado num período de observação de 48h. A DL₅₀ foi calculada pela análise de probitos usando o número total de camundongos mortos por dose de veneno durante o período de observação.

DOSE MÍNIMA HEMORRÁGICA (DMH). A DMH é definida como a menor quantidade de veneno, em µg, que, quando injetada i.d., na pele do dorso do rato, produz uma lesão hemorrágica de 10mm de diâmetro em leituras feitas 24h após a injeção. Para a determinação da DMH usou-se, neste trabalho, o método descrito por Kondo et al. (3). Alíquotas de 0,1 ml das soluções de veneno em 0.15M de NaCl em concentrações que variavam de 5 a 100µg foram injetadas, i.d., na pele previamente depilada, do dorso de ratos adultos (230-270g) sob anestesia leve com éter. Vinte e quatro horas depois, os animais foram anestesiados com éter, exanguinados por punção dos vasos do pescoço, a pele do dorso removida e transferida para um suporte que permitisse transluminação e, com o auxílio de um paquímetro, dois diâmetros em ângulo reto eram medidos. Com esses valores calculava-se o diâmetro médio para cada dose de veneno. A seguir, através de

FURTADO, M.F.D., COLLETO, G.M.D.D., DIAS DA SILVA, W. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. I. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus* usando amostras secas à temperatura ambiente ou liofilizadas. *Mem. Inst. Butantan*, v. 53, n. 2, p. 149-159, 1991.

regressão linear, foram obtidas as DMH, que é a dose de veneno capaz de produzir uma lesão hemorrágica de 10mm.

DOSE MÍNIMA NECROSANTE (DMN). A DMN é definida como a menor quantidade de veneno em μg que, quando injetada, i.d., na pele do rato, produz após 3 dias uma lesão necrótica característica. Para a determinação da DMN usou-se o mesmo método descrito acima para a determinação da DMH. Uma DMN corresponde à dose de veneno que produz uma lesão necrótica com 5mm de diâmetro.

DETERMINAÇÃO DO EFEITO EDEMATOGÊNICO. Para a determinação da atividade edematogênica dos venenos empregou-se, com algumas modificações, o método de Yamakawa et al. (20). Grupos de 8 camundongos albinos, não isogênicos, pesando 18-22g, foram injetados, i.c., no coxim da pata direita, "experimental", com 0.05 ml da solução de veneno diluído em 0.15 M NaCl estéril e no correspondente local da pata esquerda, "controle", apenas 0.05 ml da mesma solução de salina estéril. A espessura dos coxins foi medida usando-se um micrômetro (Mitutoyo-sensibilidade de 0,01-9,0 mm) nos tempos 15 min, 30 min, 1h, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h e 72h. O edema foi expresso pela diferença entre os aumentos de espessura nos coxins das patas "experimental" e "controle" dividida pelos valores das espessuras nas patas "controle" multiplicado por 100. Com esses valores construiu-se um gráfico do aumento da espessura da pata "experimental" em função do tempo.

A DOSE EDEMATOGÊNICA MÍNIMA (DEM). É definida como a menor quantidade de veneno que induz 30% do aumento máximo da espessura da pata "experimental". Para determinar a DEM usou-se o mesmo método descrito acima, utilizando-se, porém, diferentes doses de veneno e medindo-se as espessuras 3h após a injeção do veneno. Os valores correspondentes aos aumentos na espessura das patas "experimentais" foram analisados através de regressão linear tomando-se como DEM a dose que produzia 30% de aumento.

As amostras de "veneno seco" e "veneno liofilizado" foram ensaiadas em paralelo em todos os testes. Todas as soluções de veneno foram preparadas no momento do uso.

ANÁLISE ESTATÍSTICA. Os dois processos, seco a vácuo e liofilizado, foram comparados em todas as variáveis estudadas através de testes não paramétricos de comparação de duas amostras pareadas (Wilcoxon paired sample test "Z"), considerando-se como "pares" os resultados obtidos na mesma espécie nos dois processos (21).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Tabelas 2 e 3 resumem os resultados obtidos neste trabalho. Quase todos os venenos analisados contêm um teor protéico da ordem de 1,0-1,5 mg de proteínas totais/mg de veneno dosadas pelo método colorimétrico de Lowry et al. (6). A exceção é o veneno de *B. cotiara* cujos valores para a concentração em proteínas totais são da ordem de 0,85mg/mg de peso seco de veneno. A diferença para mais entre os valores para proteínas totais obtidas pelo método colorimétrico em relação aos valores em peso seco de veneno pode ser explicada pela maior quantidade de aminoácidos aromáticos nos venenos em relação ao padrão na construção da curva de referência e padronização dos reagentes de albumina bovina utilizada. Os teores protéicos em ambas as alíquotas, "veneno seco" e

FURTADO, M.F.D., COLLETO, G.M.D.D., DIAS DA SILVA, W. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. I. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus* usando amostras secas à temperatura ambiente ou liofilizadas. *Mem. Inst. Butantan*, v. 53, n. 2, p. 149-159, 1991.

“veneno liofilizado”, não variaram significativamente ($Z = 0,21$; $P = 0,83$) para cada amostra de veneno, indicando que os dois processos de desidratação, isto é, secagem à temperatura ambiente e liofilização, foram similarmente eficazes.

A atividade caseinolítica foi estudada através de análise de variância de dois fatores: processo e espécie. Essa análise demonstrou que não existe diferença significativa entre os dois processos ($F = 0,282$; $P = 0,60$) mas existem diferenças significantes entre as espécies ($F = 1000,0$; $P = 0,000$). A seguir foi utilizado o teste de Tukey (Tabela 4) para se verificar as diferenças entre cada duas espécies, e observamos que as espécies *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops cotiara* não diferem entre si, mas diferem de todas as outras e são as com menor ação caseinolítica. *Bothrops alternatus* é significativamente diferente de todas as outras. *Bothrops jararaca*, *B. neuwiedi* e *B. jararacussu* não diferem entre si mas diferem significativamente de todas as outras; *B. moojeni* e *B. atrox* são significativamente diferentes entre si e entre todos os outros venenos, sendo os mais ativos na caseinólise.

Como, via de regra, a atividade caseinolítica não variava apreciavelmente nas alíquotas de veneno seco e liofilizado, os métodos de secagem à temperatura ambiente e liofilização do veneno ou não interferiram ou exerceram igual efeito sobre as enzimas proteolíticas que hidrolizam caseína que se encontram presentes nos venenos.

A ação coagulante sobre o fibrinogênio, ação tipo trombina, apresentou ampla variação entre os venenos ensaiados, sendo os venenos de *B. atrox*, *B. cotiara* e *B. neuwiedi* os mais ativos, como podemos observar na Tabela 2. Já a ação coagulante sobre o plasma foi muito mais potente no veneno da *B. moojeni* (DMC-P = $22,6\mu\text{g}$) quando comparado com os venenos das demais serpentes do gênero *Bothrops*. O veneno do *C. d. terrificus* mostrou-se muito pouco ativo (DMC-P = $392-329\mu\text{g}$). As comparações entre os dois processos (vácuo e liofilizado) nas duas atividades coagulantes (fibrinogênio e plasma) foram realizadas através dos testes de Wilcoxon e mostraram que não existem diferenças significantes entre os dois processos ($Z = 0,07$; $P = 0,94$ para o fibrinogênio e para o plasma).

A atividade tóxica dos venenos das serpentes do gênero *Bothrops* variou muito com a espécie: os venenos de *B. jararaca* e *B. neuwiedi* foram os mais tóxicos (DL_{50} em torno de $30\mu\text{g}/\text{camundongo}$) enquanto os venenos de *B. atrox* e *B. moojeni* foram os menos tóxicos (DL_{50} em torno de $90\mu\text{g}/\text{camundongo}$). Também, sem nenhuma surpresa, o veneno mais tóxico foi o de *C. d. terrificus* (DL_{50} em torno de $1,0$ a $1,2\mu\text{g}/\text{camundongo}$) A comparação entre os dois processos deu um resultado no limite de 5% ($Z = 1,89$; $P = 0,059$), sendo que o processo a vácuo mostrou valores maiores, e portanto com menor toxicidade.

A atividade hemorrágica presente nos venenos das serpentes do gênero *Bothrops* variou muito pouco entre as espécies estudadas. A DMH oscilou entre 12 e $17\mu\text{g}/\text{rato}$, com exceção do veneno de *B. neuwiedi* que apresentou uma atividade hemorrágica muito alta com a DMH em torno de $8,0\mu\text{g}/\text{rato}$. Como era de se esperar, o veneno de *C. d. terrificus* não produziu lesão hemorrágica no local de injeção. A comparação entre os dois processos mostrou que os resultados não diferem estatisticamente ($Z = 1,27$; $P = 0,20$).

A atividade necrosante dos venenos botrópicos foi semelhante à observada com a atividade hemorrágica. A DMN variou de 50 a $70\mu\text{g}/\text{rato}$ na maioria dos venenos sendo, contudo, mais baixa no veneno de *B. neuwiedi* ($35\mu\text{g}/\text{rato}$). O

FURTADO, M.F.D., COLLETO, G.M.D.D., DIAS DA SILVA, W. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. I. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus* usando amostras secas à temperatura ambiente ou liofilizadas. *Mem. Inst. Butantan*, v. 53, n. 2, p. 149-159, 1991.

veneno de *C. d. terrificus* também não produziu necrose no local da injeção do veneno. Os dois processos mostraram resultados semelhantes ($Z = 0,25$; $P = 0,80$).

A atividade edematogênica dos venenos botrópicos foi marcadamente uniforme nas diferentes espécies, sendo os venenos de *B. moojeni* e *B. neuwiedi* os mais ativos. Também neste caso os dois processos não deram resultados diferentes estatisticamente ($Z = 1,61$; $P = 0,10$).

A análise de correlação entre a atividade edematogênica e a atividade necrosante mostrou um resultado próximo do nível de significância de 5% ($Z = 0,51$; $P = 0,06$). Isso sugere que outros estudos destinados a esclarecer tal correlação possam ser conduzidos.

Os resultados apresentados nesse trabalho mostram que três métodos *in vitro* (titulação de proteínas, atividade coagulante sobre fibrinogênio e plasma e atividade caseinolítica), quatro métodos *in vivo* (atividade letal, atividade hemorrágica, atividade necrosante e atividade edematogênica) podem servir como métodos de rotina para o controle de qualidade dos venenos de serpentes coletados e armazenados para fins de pesquisa e de produção de soros antivenenos. Verificou-se, além disso, que para uma mesma espécie e para a mesma partida de veneno as amostras processadas por secagem a vácuo e liofilizadas não apresentam diferenças em todas as variáveis estudadas.

Observações recentes mostraram que as enzimas proteolíticas presentes nos venenos de *Agkistrodon contortrix*, *Bothrops atrox*, *moojeni* e *Echis carinatus sochureki* eram inativadas, mais intensa e rapidamente a 37° C e, a seguir, em ordem decrescente, a temperatura ambiente, a 4° C e a 20° C (7). Desde que as atividades enzimáticas e biológicas dos venenos não diferem nos dois processos, deveria-se escolher a liofilização como o método de preparação de veneno, pelo fato de associar, durante o processo de secagem, congelamento e vácuo, condições que presumivelmente preservariam melhor a configuração molecular natural da maioria das proteínas.

De posse dos principais parâmetros para a avaliação das principais atividades biológicas dos venenos das serpentes brasileiras dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*, pode-se titular os anticorpos presentes nos correspondentes soros antivenenos que especificamente neutralizam as atividades proteolíticas, coagulante do fibrinogênio e do plasma, edematogênica, hemorrágica, necrosante e letal. Tais informações serão importantes não só para o conhecimento das atividades anti-tóxicas dos anticorpos como para o controle dos processos de fracionamento e concentração dos soros antivenenos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Srta. Vera Lúcia Ap. Rodrigues pela assistência técnica.

ABSTRACT: Methods were standardized to evaluate the fibrinogen or plasma coagulation promoting effects and the edematogenic, hemorrhagic, necrotising and lethality inducing activities present in some Brazilian snake venoms (*B. alternatus*, *B. atrox*, *B. cotiara*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi* and *Crotalus durissus terrificus*). Venoms from each species were pooled, the protein contents determined by the Lowry's method, divided into two equal samples, one being vacuum-

FURTADO, M.F.D., COLLETO, G.M.D.D., DIAS DA SILVA, W. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. I. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus* usando amostras secas à temperatura ambiente ou liofilizadas. *Mem. Inst. Butantan*, v. 53, n. 2, p. 149-159, 1991.

dried at room temperature (DV) and the other lyophilized (LV), and stored at -20°C . The protein contents were around 1.0-1.5 mg/mg of dried venom in the venoms from the most species and around 0.8-0.85 mg/mg of dried venom in the venom from *B. cotiara*. Enzymatic activities, as measured by casein proteolysis, was very pronounced in the venoms from *B. atrox* and *B. moojeni*, low in the venom from *B. cotiara*, intermediate in the other *Bothrops* venoms and barely detectable in the venom from *C. d. terrificus*. The hemorrhagic and necrotising activities although present in the venom of all *Bothrops* species were pronounced in the venom of *B. neuwiedi* and absent in the venom from *C. d. terrificus*. All venoms tested exhibit patent edematogenic activity. The coagulation promoting activity present in all venoms was higher in the venoms of *B. atrox*, *B. cotiara* and *B. neuwiedi*. The lethal activity, measured in terms of LD_{50} , was remarkably higher in the venoms of *C. d. terrificus* and high in the venoms of *B. jararaca* and *B. neuwiedi* in comparison with the other *Bothrops* species. The drying procedures analyzed had no influence on the venoms biological and enzymatic activities. Although a decrease in the enzymatic or in the biological activities was not observed neither in DV nor in LV, lyophilization of the snake venoms to be stored should be the choice method because the association of freezing temperature and vacuum preserve better the correct molecular configuration the most of proteins.

KEYWORDS: *Animal venoms, drying procedures and biological activities of snake venoms.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde. A ação do Ministério da Saúde no controle dos acidentes ofídicos em âmbito nacional. Brasília. 1986.
2. CHAYKIN, S. Methods for protein determination. In: *Biochemistry Laboratory Techniques*. New York, John Wiley. Cap. 2, p. 14-21, 1966.
3. KONDO, H.; KONDOS.; IKEZAWA, K.; MURATA, R. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. *Jap. J. Med. Sci. Biol.* 13, 43-51, 1960.
4. KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J.Gen.Physiol.*, 40: 291-310, 1947.
5. LOMONTE, B. & GUTIÉRREZ, J.M. La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseína. *Rev.Biol.Trop.*, 31(1): 37-40, 1983.
6. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, I.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J.biol.Chem.*, 193: 265-275, 1951.
7. MEIER, J.; ADLER, C.; LO CASCIO, R. A prospective study on enzyme stability of three VIPERIDAE snake venoms stored as liquid under different conditions. 8th European Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins, Poréc, Yugoslavia, *Toxicon*, Vol. 28, pag. 158, 1990.
8. SCHOTTLER, W.H.A. — Toxicity of the principal snake venoms of Brazil. *Amer.J.trop.Med.*, 31: 489-499, 1951.
9. SCHOTTLER, W.H.A. — Antigen-antibody relations in the present antivenin production of Brazil. *Amer.J.trop.Med.*, 31: 500-509, 1951.
10. SCHOTTLER, W.H.A. — Problems of antivenin standardization. *Bull. World Hlth. Org.*, 5: 293-320, 1952.
11. SCHOTTLER, W.H.A. — Aspectos metodológicas da titulação de soros antipeçonhentos. *Mem. Inst. Butantan*, 26: 249-256, 1954.
12. SCHOTTLER, W.H.A. — Serological analysis of venoms and antivenins. *Bull. World Hlth. Org.*, 12: 877-903, 1955.

FURTADO, M.F.D., COLLETO, G.M.D.D., DIAS DA SILVA, W. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. I. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus* usando amostras secas à temperatura ambiente ou liofilizadas. *Mem. Inst. Butantan*, v. 53, n. 2, p. 149-159, 1991.

13. SCHOTTLER, W.H.A. — Observações miscelâneas sobre peçonhas ofídicas e antivenenos. *Mem. Inst. Butantan*, 27: 73-105, 1955/56.
14. SCHOTTLER, W.H.A. — Reference toxins for antivenin standardization. *Bull. World Hlth Org.*, 19: 341-361, 1958.
15. SILES VILLARROEL, M. Contribuição ao estudo de venenos e antivenenos botrópicos. Tese de Livre-Docência. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas, 83p., 1977.
16. THEAKSTON, R.D.G. Characterization of venoms and standardization of antivenoms. In: *Natural toxins*. Ed. John B. Harris. Chap. 15: 287-303. Claredon Press. Oxford, 1986.
17. THEAKSTON, R.D.G. & REID, H.A. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bull. World Hlth. Org.*, 61: 949-956, 1983.
18. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert Committee on Biological Standardization. *Wld. Hlth Org. Tech. Rep. Ser.*, 108, 1956.
19. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. *Off set Publication n° 58*. World Health Organization. Geneva, 1981.
20. YAMAKAWA, M.; NOZAKI, M.; HOKAWA, Z. Fractionation of Sakishimahabu (*Trimeresurus elegans*) venom and lethal, hemorrhagic and edema-forming activities of the fractions. In: A. OHSAKA, K. HAYASHI, Q.Y. SAWAY (eds.). *Animal, Plant and Microbial Toxins*, vol. 1 Plenum Press, New York, 1976.
21. ZAR, J.H. *Bioestatistical Analysis*. Second Edition. Prentice-Hall, INC, New Jersey. v- xiv, 1-718. 1984.

TABELA 2

Quantidade de proteínas tóxicas e dos fatores coagulantes do soro plasmático e plasma dos venenos de oito espécies de serpentes das famílias Bothropidae e Crotalidae

| ESPECIE | Proteína tóxica (mg/ml) | Quantidade de proteínas tóxicas (µg por mg ven.) (X ± SD) (X ± SD) (X ± SD) | Proteína coagulante (mg/ml) | Quantidade de proteínas coagulantes (µg por mg ven.) (X ± SD) (X ± SD) (X ± SD) |
|---------------------------|-------------------------|---|-----------------------------|---|
| <i>B. aspidoterpis</i> | 0,12 | 1,02 ± 0,10 | 0,12 | 1,02 ± 0,10 |
| <i>B. carolinensis</i> | 0,12 | 1,02 ± 0,10 | 0,12 | 1,02 ± 0,10 |
| <i>B. coronellus</i> | 0,12 | 1,02 ± 0,10 | 0,12 | 1,02 ± 0,10 |
| <i>B. jarrovi</i> | 0,12 | 1,02 ± 0,10 | 0,12 | 1,02 ± 0,10 |
| <i>B. leucurus</i> | 0,12 | 1,02 ± 0,10 | 0,12 | 1,02 ± 0,10 |
| <i>B. maculatus</i> | 0,12 | 1,02 ± 0,10 | 0,12 | 1,02 ± 0,10 |
| <i>B. munitus</i> | 0,12 | 1,02 ± 0,10 | 0,12 | 1,02 ± 0,10 |
| <i>B. obovatus</i> | 0,12 | 1,02 ± 0,10 | 0,12 | 1,02 ± 0,10 |
| <i>B. polyommatus</i> | 0,12 | 1,02 ± 0,10 | 0,12 | 1,02 ± 0,10 |
| <i>B. septentrionalis</i> | 0,12 | 1,02 ± 0,10 | 0,12 | 1,02 ± 0,10 |
| <i>B. simonseni</i> | 0,12 | 1,02 ± 0,10 | 0,12 | 1,02 ± 0,10 |
| <i>B. taylori</i> | 0,12 | 1,02 ± 0,10 | 0,12 | 1,02 ± 0,10 |
| <i>B. tigris</i> | 0,12 | 1,02 ± 0,10 | 0,12 | 1,02 ± 0,10 |
| <i>B. vanzoi</i> | 0,12 | 1,02 ± 0,10 | 0,12 | 1,02 ± 0,10 |
| <i>B. yuki</i> | 0,12 | 1,02 ± 0,10 | 0,12 | 1,02 ± 0,10 |
| MÉDIA | | | | |
| GRUPOS HOMOGÊNEOS | | | | |

FURTADO, M.F.D., COLLETO, G.M.D.D., DIAS DA SILVA, W. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. I. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus* usando amostras secas à temperatura ambiente ou liofilizadas. *Mem. Inst. Butantan*, v. 53, n. 2, p. 149-159, 1991.

TABELA 1
Venenos Referência Internacionais propostos (16).

| ESPÉCIES | PROCEDÊNCIA |
|----------------------------------|-------------|
| <i>Naja n. kaouthia</i> | Tailândia |
| <i>Naja scutatus</i> | Austrália |
| <i>Echis carinatus</i> | Mali |
| <i>Echis carinatus</i> | Irã |
| <i>Vipera russelli</i> | Tailândia |
| <i>Crotalus atrox</i> | México |
| <i>Bothrops atrox asper</i> | Costa Rica |
| <i>Trimeresurus flavoviridis</i> | Japão |

TABELA 2

Quantidade de proteínas totais, atividade caseinolítica e dose mínima coagulante sobre fibrinogênio e plasma dos venenos de oito espécies de serpentes brasileiras.

| Espécies | Processo de secagem | Quantidade de proteína ($\mu\text{g prot./mg ven.}$) ($X \pm SD$) | Atividade caseinolítica (U/mg ven.) ($X \pm SD$) | Dose mínima coagulante fibrinogênio (mg/l) | plasma (mg/l) |
|------------------------|---------------------|---|--|--|---------------|
| <i>B. alternatus</i> | vácuo | 1.441 \pm 54 | 48,8 \pm 3,0 | 191,8 | 47,1 |
| | liofilizado | 1.010 \pm 27 | 47,3 \pm 3,6 | 225,1 | 51,0 |
| <i>B. atrox</i> | vácuo | 1.169 \pm 56 | 243,0 \pm 8,0 | 103,2 | 67,8 |
| | liofilizado | 1.253 \pm 42 | 198,3 \pm 6,8 | 57,8 | 80,9 |
| <i>B. cotiara</i> | vácuo | 847 \pm 11 | 10,5 \pm 2,4 | 78,75 | 92,4 |
| | liofilizado | 870 \pm 19 | 13,0 \pm 3,7 | 97,2 | 84,5 |
| <i>B. jararaca</i> | vácuo | 1.156 \pm 12 | 83,7 \pm 3,8 | 124,8 | 115,0 |
| | liofilizado | 1.147 \pm 54 | 105,8 \pm 5,3 | 209,8 | 90,6 |
| <i>B. jararacussu</i> | vácuo | 1.129 \pm 56 | 106,0 \pm 2,7 | 236,6 | 42,7 |
| | liofilizado | 1.037 \pm 26 | 95,8 \pm 3,5 | 211,9 | 42,8 |
| <i>B. moojeni</i> | vácuo | 1.344 \pm 103 | 163,8 \pm 10,0 | 195,7 | 22,6 |
| | liofilizado | 1.372 \pm 78 | 203,0 \pm 12,8 | 205,7 | 19,3 |
| <i>B. neuwiedi</i> | vácuo | 1.256 \pm 36 | 101,0 \pm 3,7 | 101,1 | 81,2 |
| | liofilizado | 1.472 \pm 37 | 98,3 \pm 5,7 | 54,4 | 86,2 |
| <i>C.d. terrificus</i> | vácuo | 1.504 \pm 53 | 9,4 \pm 1,8 | 122,3 | 392,8 |
| | liofilizado | 1.363 \pm 53 | 7,7 \pm 1,2 | 105,3 | 329,1 |

FURTADO, M.F.D., COLLETO, G.M.D.D., DIAS DA SILVA, W. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. I. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus* usando amostras secas à temperatura ambiente ou liofilizadas. *Mem. Inst. Butantan*, v. 53, n. 2, p. 149-159, 1991.

TABELA 3

Dose Letal 50% (DL₅₀, Doses Mínimas Hemorrágicas, Necrosante e Endematogênica de venenos de oito espécies de serpentes brasileiras.

| Espécies | Processo de secagem | Dose letal 50% (µg/camundongo) | Dose mínima hemorrágica (µg/rato) | Dose mínima necrosante (µg/rato) | Dose mínima edematogênica (µg/camundongo) |
|------------------------|---------------------|--------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|---|
| <i>B. alternatus</i> | vácuo | 78,5(69-91) | 16,8 | 64,4 | 0,64 |
| | liofilizado | 67,5(59-76) | 14,4 | 70,6 | 0,66 |
| <i>B. atrox</i> | vácuo | 104,1(94-117) | 15,8 | 52,5 | 0,45 |
| | liofilizado | 89,1(84-96) | 13,6 | 59,5 | 0,33 |
| <i>B. cotiara</i> | vácuo | 57,6(51-66) | 20,0 | 58,6 | 0,39 |
| | liofilizado | 35,2(27-41) | 20,2 | 67,8 | 0,52 |
| <i>B. jararaca</i> | vácuo | 28,2(26-32) | 15,5 | 66,5 | 0,38 |
| | liofilizado | 24,7(23-26) | 15,6 | 66,9 | 0,51 |
| <i>B. jararacussu</i> | vácuo | 60,2(51-69) | 17,4 | 60,7 | 0,46 |
| | liofilizado | 58,8(52-67) | 17,7 | 50,2 | 0,55 |
| <i>B. moojeni</i> | vácuo | 90,1(72-98) | 17,3 | 55,3 | 0,35 |
| | liofilizado | 92,3(78-100) | 15,9 | 45,5 | 0,35 |
| <i>B. neuwiedi</i> | vácuo | 36,5(31-44) | 7,7 | 40,2 | 0,36 |
| | liofilizado | 30,3(25-41) | 8,9 | 33,6 | 0,40 |
| <i>C.d. terrificus</i> | vácuo | 1,1(0,88-1,27) | — | — | 0,34 |
| | liofilizado | 1,2(0,96-1,67) | — | — | 0,58 |

TABELA 4

Testes de comparações múltiplas entre as espécies de *Bothrops* para os valores da atividade caseinolítica.

| ESPÉCIE | MÉDIA | GRUPOS HOMOGÊNIOS |
|------------------------|-----------|-------------------|
| <i>C.d. terrificus</i> | 8.71429 | * |
| <i>B. cotiara</i> | 11.75000 | * |
| <i>B. alternatus</i> | 48.00000 | * |
| <i>B. jararaca</i> | 96.28571 | * |
| <i>B. neuwiedi</i> | 99.62500 | * |
| <i>B. jararacussu</i> | 100.87500 | * |
| <i>B. moojeni</i> | 180.57143 | * |
| <i>B. atrox</i> | 220.62500 | * |

